第8卷 第3期　　动 物 学 研 究　　Vol.8, No.3
1987年8月　　ZOOLOGICAL RESEARCH　　Aug., 1987

鳙鱼 *ARISTICHTHYS NOBILIS* 早期发育的一些生物化学上的变化

刘荣臻　　王　浩

（南京大学生物系）

摘　　要

本实验第一部分对鳙鱼卵及胚胎在不同的发育时期蛋白质合成的速度进行了研究，实验采用微量克氏定氮法，对鳙卵从未受精卵到受精卵、尾芽期和出膜期，共测定了十三个不同的发育时期。实验结果表明了在鱼的不同胚胎发育时期蛋白质合成速度有着明显的差异。

实验的第二部分对鳙鱼胚胎发育过程氨基酸组成和氨基酸含量进行了测定，其结果显示出鳙鱼卵和胚胎的各发育时期氨基酸的组分十分相似，但氨基酸的含量在各个时期是有差异的。

关键词　鳙鱼　胚胎发育　蛋白质合成　氨基酸

胚胎发育过程中蛋白质合成代谢的研究是了解和掌握生命代谢机制的一个重要方面。因此，这方面工作已有许多学者进行了研究。Kavanau (1953)，陈国栋 (1963)，Monroy(1950), Michizo(1978), Ohi, y.(1962) 及 Glardina(1955) 等过去对一部分动物胚胎发育各个时期进行过研究，但对鳙鱼胚胎发育早期蛋白质和氨基酸的代谢则研究的很少，因此，我们测定和分析了鳙鱼胚胎发育各个时期蛋白质合成和氨基酸的含量，从而进一步探索动物形态分化与蛋白质合成的规律。

材 料 和 方 法

本实验所用材料取自南京胜利圩鱼场，鱼体每公斤注射5微升脑垂体和绒毛膜促性腺激素，实验所用材料均通过解剖镜下检查选取，胚胎发育分期按照中国科学院实验生物所编的家鱼人工繁殖的研究一书中白鲢胚胎发育分期。本实验第一部分蛋白质测定采用克氏定氮法（张龙翔，1958），每次实验共分十三个组，未受精卵、受精卵、2细胞、4细胞、8细胞、16细胞、32细胞、64细胞、高囊胚期、原肠中期、神经胚期、尾

本文1986年1月27日收到，1986年7月29日收到修改稿。

芽期、出膜期，然后进行蛋白质测定分析。每组实验取10颗卵放入50毫升克氏消化瓶中，并立即加入硫酸3毫升进行消化，同一胚胎发育时期取3管，每管测定重复三次以上取其相近数据。每次实验均作空白对照。完整的卵以干重计算；在进行分析取材的同时另取70个卵在85°—95°C烘箱中烘至恒重，然后称重求其平均值。胚胎蛋白质含量的计算方法如下：

WN（每个卵中总氮量）＝(X－B) ×0.071毫克

X滴定样品所用HCl的毫升数

B滴定空白所用去HCl的毫升数

0.071为稀释的倍数，当量数、材料重等数值约简后的数值。

所取的材料经微量克氏定氮测定的总氮量再换算出蛋白质的含量即WN×6.25而得每个卵中所含的蛋白质量。

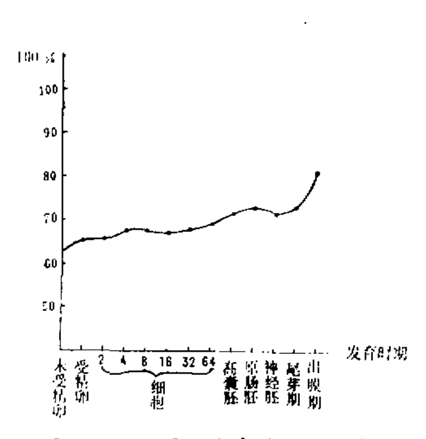
鳙鱼卵干重平均为0.671毫克／1卵。

实验的第二部分为鳙鱼胚胎早期氨基酸的测定。氨基酸含量的测定：将发育正常的鳙鱼卵或早期胚胎剥去受精膜，取20颗卵或胚胎置于匀浆器中，加入重蒸馏水1毫升匀浆，离心（8000转／分）10分钟，吸取上清液置试管中，加入6N盐酸2毫升在110°C温度加温27小时，直至试管蒸干，抽去剩余的盐酸，再加入pH2.2盐酸置日本835—50高速氨基酸自动分析仪进行测定。共测定了卵裂期、囊胚早期、原肠早期、下包1/2、原肠晚期、神经胚期、体节出现期共七个胚胎发育时期的含量。

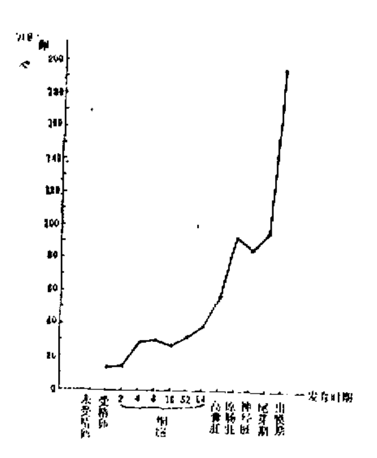
实验结果

蛋白质分析每一消化的样品经蒸馏后用0.01N盐酸滴定，然后换算出总氮量，百分含量，增加量（见表1）。相对增加量是胚胎发育中的下一个时期与上一时期的相对增加量，一个胚胎与未受精卵比较增加的蛋白质含量见表1和图（一）。实验结果证明，鳙鱼胚胎发育各时期，蛋白质合成的速度为缓慢的上升，未受精卵蛋白质百分含量424.9微克，卵受精30分钟后，所测得的蛋白质量438.4微克，因此受精过程中蛋白质合成增加了0.0135毫克/卵。从未受精卵到出膜期蛋白含量增加到540.3微克/卵，从未受精卵到出膜期共增加101.9微克，从图（一）可以明显观察到囊胚期以后，蛋白质合成的速度显著加快，从尾芽期开始，蛋白质合成急速上升直到出膜期达到最高值。这一结果与陈国栋对白鲢胚胎发育过程蛋白质的分析结果相一致。但从相对增加量计算，各时期蛋白质增加量是一致的，有的时期增加量多，有的时期增加量少，甚至个别发育时期如神经胚晚期，略低于原肠中期的蛋白质量的水平。

鳙鱼胚胎发育过程氨基酸的分析：实验使用同一条鱼所产的卵，进行了氨基酸的定量和定性分析。实验共测定卵裂期、囊胚早期、囊胚中期、原肠早期、原肠中期、原肠晚期、神经胚期、体节出现八个时期，分析结果表明，有牛磺酸、天门冬氨酸、苏氨酸、丝氨酸、谷氨酸、甘氨酸、丙氨酸、胱氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸、组氨酸、精氨酸、脯氨酸、甲硫氨酸。其中胱氨酸和甲硫氨酸变动较大。胱氨酸在卵裂期和原肠早期出现，而其他各时期都消失，而甲硫氨酸从卵裂期一



图一　鳙鱼早期发育蛋白质百分含量（%）



图二　鳙鱼早期发育蛋白质合成增长量（μg/卵）

表 I　　鳙鱼胚胎发育中的蛋白质含量

编号	胚胎发育分期	每颗卵中的总氮量和蛋白质含量（毫克）				
		总氮量 (WN)×10^{-2}	蛋白质含量 (WN)×6.25	百分含量* %	相对增加量	累积增加量
1	未受精卵	6.798	0.4249	63.32	—	—
2	受精卵	7.014	0.4384	65.34	0.0135	0.0135
3	二细胞	7.032	0.4395	65.50	0.0011	0.0146
4	四细胞	7.254	0.4534	67.57	0.0139	0.0285
5	八细胞	7.278	0.4549	67.79	0.0015	0.0300
6	十六细胞	7.242	0.4526	67.45	-0.0023	0.0277
7	三十二细胞	7.314	0.4571	68.12	0.0045	0.0322
8	六十四细胞	7.414	0.4635	69.08	0.0064	0.0386
9	高囊胚期	7.710	0.4819	71.82	0.0184	0.0570
10	原肠中期	7.806	0.4879	72.71	0.0360	0.0930
11	神经胚期	7.692	0.4808	71.65	0.0071	0.0859
12	尾芽期	7.854	0.4909	73.16	-0.0101	0.0960
13	出膜期	8.644	0.5403	80.52	0.0994	0.1954

* 百分含量是测定的蛋白质含量与卵重0.671毫克比较的百分数

直发育到囊胚期均未见出现，直到原肠早期又出现，发育到原肠晚期又消失（表Ⅰ），但到神经胚期和体节出现期又重新出现。实验中我们同时发现卵裂后期氨基酸显著增加，囊胚早期稍有下降，直到原肠早期各种氨基酸又恢复到囊胚早期的水平，但仍不如卵裂后期高，胚胎下包 1/2 时期时，氨基酸下降到最低值，胚胎发育原肠晚期、神经胚期、体节出现期，氨基酸是逐渐增加，恢复到原肠早期和囊胚早期稍低的水平。实验结果分析，鳙鱼胚胎氨基酸测定值以卵裂后期为最高，在原肠早期胎盘下包 1/2 时，氨基酸又减少到最低值，从整个趋势看，氨基酸值是有起伏变化的，实验还对体节出现时期各种氨基酸作了定量分析如表Ⅱ。

表Ⅱ 鳙鱼胚胎体节出现期氨基酸的测定

名称	毫微克数/50μl	N Mol	N Gram
天门冬氨酸	Asp	17.536	2332.32
苏氨酸	Thr	14.339	1706.35
丝氨酸	Ser	16.433	1725.55
谷氨酸	Glu	33.183	4881.22
脯氨酸	Pro	16.747	1925.97
甘氨酸	Gly	20.815	1561.14
丙氨酸	Ala	40.268	3587.88
$\frac{1}{2}$胱氨酸	$\frac{1}{2}$Cys-Cys	0.652×2	156.66×2
缬氨酸	Val	13.706	1606.38
甲硫氨酸	Met	0.279	41.66
异亮氨酸	Ile	11.725	1538.35
亮氨酸	Leu	29.484	3868.30
酪氨酸	Tyr	5.616	1017.62
苯丙氨酸	Phe	8.168	1349.39
赖氨酸	Lys	14.704	2149.82
氨	NH_3	48.509	824.64
组氨酸	His	4.945	767.58
精氨酸	Arg	12.824	2234.11

注：此法因是酸水解，故色氨酸破坏，谷氨醯胺和天门冬醯胺的醯胺基被水解掉而成为天门冬氨酸和谷氨酸，溶液中有氨产生。从表Ⅱ得知鳙鱼出膜时期谷氨酸含量为最高，亮氨酸和丙氨酸次之，但以脯氨酸为最低。

讨　　论

本实验较完整和全面地分析了鳙鱼胚胎发育过程蛋白质合成和氨基酸含量的情况，蛋白质在卵裂时期合成速度很慢，直到囊胚期，原肠期开始加速，出膜期蛋白质合成达最大速度，作者认为卵裂时期卵细胞不断的分裂，但是体积并不增加，因此蛋白质合成的速度也很缓慢是可以理解的，上述结果与陈国栋1963年分析白鲢卵的蛋白质的结果相似，以及从受精卵到出膜期蛋白质合成的总趋势是增加的，但各个发育时期的增加量是不一致的，囊胚期、原肠期合成蛋白质速度增加，这是由于原肠期胚胎组织开始分化，分化成三胚层，各种蛋白质合成将为分化成不同器官原基作好物质准备，需要形成各种特异的蛋白质，因此蛋白质合成速度加快，特别是从尾芽期到出膜期，蛋白质合成速度急速进行，鱼类在出膜之前完全靠卵黄作为能量的主要来源，一旦出膜即将进入以外源摄取食物维生，所以此时期将要合成大量的特异蛋白为完备各种器官的发生所必需，以作进入另一种生活方式独立而生活的一切装备。在氨基酸分析实验中发现鳙鱼胚胎中氨基酸含量是有节奏性地变化，这一结果与Kavanau, J. L. (1953) (1954) 对海胆卵发育过程中氨基酸代谢以周期性变化相一致。

本实验发现从蛋白质和氨基酸的分析结果是相辅相成的，如在囊胚期之前发育早期蛋白质合成量很少而氨基酸含量则最高，蛋白质在原肠中期合成速度显著增加，但氨基酸在此时期含量下降最低值，因此作者认为一个时期所表现任何情况和状态不一定适合于另一时期，但不同动物在同一胚胎发育代谢规律存在着一定的相似性。EakIn, RM. (1950)对两栖类胚胎分析中也得到类似的结果，他实验结果也证明蛋白质合成以原肠开始，随着胚胎发育逐渐越来越显著。

蛋白质合成是生命现象的主要表现，虽然迄今为止，还没有把化学改变与特殊蛋白质合成联系起来，至于神经胚时期蛋白质含量下降到高囊胚时的含量，胚胎发育到尾芽期蛋白质含量又上升为原肠胚的水平，这一现象是否由于三胚层分化已经建立，而神经胚期着重在神经系统的分化，蛋白质的合成在这一时期处于次要地位，我们认为，可能由于在这个时期有大量的合成磷脂出现，因而表现出蛋白质合成速度下降。

至于对发育过程中组织分化时能合成这些特异蛋白，这将为发育的生物化学者提出了新的研究课题。

参 考 文 献

陈国栋 1963 白鲢胚胎发育的物质代谢，实验动物学学术讨论会论文文摘汇编 P.96

张龙翔 北京大学生物化学教研室编 生物化学实验指导 1958 人民教育出版社

Kavanau, J. L. 1953. *Metabolism of free Amino acids, peptides and proteins in early sea urchin development* J. Exp. Zool. 122, 285—337

Monroy, A., 1950 A preliminary electrophoretic analysis of proteins and protein fractions in sea urchin eggs and their changes on fertilization. Exp. Cell Res, 1. 92—104.

Giardina, G. and Monroy, A., 1955. Changes in the proteins of the sea urchin egg at fertilization. Exp. Cell Res., 8. 466—473

Ohi, Y. 1962. Water-soluble proteins in the fish egg and their changes during early development. Embryologia, 7. No 3. 208—222

Michizo Suyama and Takeshi Suzuki. 1978. Free and conjugated Amino acids in the extract of Rainbow Trout eggs. Bulletin of the Japanese society of scientific fisheries. 44(4). 345—349

Eakin, RM., W. E. Berg and P. B. Kutsky. 1950. Studies in protein Metabolism of the Amphibian embryo. I. Free Amino acids. Pro. Soc. Exp. Biol and Med., 76. 32—34

SOME BIOCHEMICAL CHANGES DURING THE EARLY DEVELOPMENT OF *ARISTICHTHYS NOBILIS*

Liu Rongzhen　　Wang Hao

(Department of Biology University of Nanjing)

The first part of this investigation deals with the rates of protein synthesis during the different early developmental stages of the egg of *Aristichtys nobilis* by means of microanalysis, using the Kjeldahl nitrogen determination method. It comprised thirteen different development at stages, from the unfertilized egg to the tail-bud with the outgrowth-of-membrane stages, namely, the entire unfertilized egg, fertilized egg, cleavages up to 64—cell, late blastula, mid-gastrula, neurula and tail-bud with outgrowth-of-membrane stages. It is found that the rates of protein synthesis during the different embryonic stages of the fish was markedly variable. Although the total amount of protein was gradually increasing throughout the entire period, but there was an obvious high peak at the blastula and a marked low one at the neurula. By the tail-bud stage it went back quantitatively to the mid-gastrula condition at which the rate of protein synthesis reached its highest rate.

The second part of the experiment deals with the combination of amino acids and also their quantily. It comprised eight developmental stages, namely, early blastula, mid-blastula, early gastrula, mid-gastrula, late neurula and somite stages. The qualitative calculations of amino acids were determined by means of a high-speed automatic amino acid analyzer (Japan made 835—50). Data were taken from the homogeneous supernatant fluid. The results showed that the component of amino acid were quite similar at all the stages of the egg and the embryo. They are Tau. Asp. Thr. Glu. Gly. Ala. Val. Ile. Leu. Tyr. Phe. Lys. His Arg. Pro. Cys. Met. and Ser, among which Cys.

and Met. varied considerably. Cys. appeared at the cleavage and early gastula stages only. Met. appeared at the early gastrula but disappeared at gastrula. For the rest of the following stages, with the quantitative analysis, Glu, appeared to be highest. and Pro. the lowest in amount at all the stages of the egg and the embryo studied.

Key words: *Aristichthys nobilis*, Embryonic development, Protein synthesis, Amino acids.